

На правах рукописи

Соколова

Соколова Марина Константиновна

Биохимический и иммунохимический анализ пространственной
организации актинового цитоскелета клеток высших растений

03.00.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Саратов – 2008 г.

Работа выполнена в Институте биохимии и физиологии растений и микроорганизмов
Российской академии наук (ИБФРМ РАН)

Научный руководитель: доктор биологических наук
Носов Александр Владимирович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Коннова Светлана Анатольевна

доктор биологических наук
Клячко Нелла Леопольдовна

Ведущая организация: Институт цитологии РАН

Защита состоится «23» апреля 2008 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета при Институте биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (410049, г. Саратов, просп. Энтузиастов, 13).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИБФРМ РАН.
Автореферат диссертации размещен на сайте <http://www.ibppm.saratov.ru/obyav.dis.html>

Автореферат разослан « 27 » февраля 2008 года.

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000431290

Учёный секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

В.Е. Никитина

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы

Как известно, жизнь во всех ее разнообразных проявлениях представляет собой непрерывное движение. Способность двигаться - одно из свойств живого на Земле.

Сложный ансамбль внутриклеточных органелл характеризуется определенным положением и определенными путями перемещения в клетке, и необходимость управлять мембранными процессами требует тонкой организации внутриклеточной подвижности. У всех изученных клеток, будь то амеба, клетка млекопитающего или растения, комплекс подвижности построен из похожих элементов. Тем не менее, каждый тип клеток отличается своим, особым спектром цитоскелетных белков, присутствующих в определенном соотношении и специфическим образом расположенных (Baskin, 2000).

На данном этапе исследований становится все более очевидным, что цитоскелет является той самой структурой клетки, которая динамически объединяет ее отдельные элементы и обеспечивает функциональную стабильность многих внутриклеточных процессов. Изучению разных аспектов функционирования и регуляции, в частности, актинового цитоскелета посвящено огромное количество работ.

В последние годы в литературе стали появляться разнообразные сведения об актинах из растительных объектов (Chaffey, 2005). Изучение актина в растениях по-прежнему сопряжено с рядом трудностей в связи с низким содержанием его в цитоплазме растительной клетки и высокой лабильностью по отношению к протеазам (Chaffey, Barlow, 2002). Поэтому эти сведения остаются весьма отрывочными и неполными по сравнению с животными объектами. В связи с этим проблема биохимической идентификации и пространственной визуализации актиновых компонентов является весьма актуальной (Hu, Brady *et al.*, 2000; Hitt, Laing *et al.*, 2002; Kwok, Hanson, 2004; Sheahan, Staiger *et al.*, 2004). Будучи одним из основных компонентов сложного комплекса цитоскелета растительной клетки, актин принимает участие в осуществлении большинства функций как внутри одной клетки: формирование микрокомпарментов (для ферментных ансамблей, биосинтеза белка), направленное движение цитоплазмы и органелл (Клячко, 2005), определение пространственного расположения составляющих клетки (Клячко, 2004), синтез клеточной стенки, митоз и мейоз; так и в системе межклеточных взаимодействий: участие в передаче сигнала с мембранных рецепторов, в регуляции транспорта веществ через плазмодесмы (Клячко, 2003), а также в механизме флоэчного транспорта (Kehr, Haebel *et al.*, 1999).

Разнообразные методы идентификации актина (Sturmer, Baumann, 1998; Reddy, 2001; Peruski, 2003; Runions, Brach *et al.*, 2006) детально разработаны лишь для мышечных объектов, в то время как для растений эти методы нуждаются в существенной модификации с учетом биохимической специфики объекта. Таким

образом, изучение топографии и биохимической организации сложного надмолекулярного комплекса белков, в основе которой лежит активный цитоскелет, необходимо для формирования более полной картины функционирования живой клетки растений. Кроме того, для понимания работы активного цитоскелета очень важно дифференцирование полимерного и мономерного состояния этого белка в клетке.

Целью данной работы было изучение пространственной организации системы белков активного цитоскелета клеток высших растений.

В работе решались следующие задачи:

1. создать набор маркёров для идентификации различных форм актина на основе функционально-активного фрагмента молекулы мышечного миозина и фаговых антиактиновых миниантител;
2. с использованием полученных маркёров изучить морфологические особенности конфигурации актин-содержащих структур клеток растений;
3. на препаратах разрушенных протопластов растительных клеток исследовать трёхмерную организацию активного цитоскелета и его связь с органеллами;
4. сравнить информативность методов иммунофлуоресцентной и электронно-микроскопической идентификации и визуализации актина в клетках растений.

Научная новизна работы

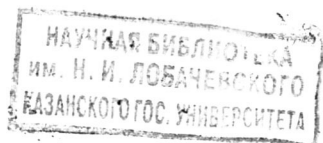
Показаны особенности и детали строения актиновых филаментов на протопластах клеток каллусных тканей моркови и табака, а также клеток мезофилла листьев табака и бобов.

Разработан метод получения специфического маркёра к актину на основе тяжелого меромиозина (функционального фрагмента молекулы миозина) и коллоидного золота.

Продемонстрирована принципиальная возможность идентификации растительных актинов с помощью антиактиновых миниантител, полученных методом фагового дисплея.

Практическая значимость работы

Разработанный нами подход с применением конъюгатов коллоидного золота с рядом узнающих молекул (антителами, миниантителами, фаллоидином и тяжёлым меромиозином), а также конъюгатов флуоресцентных меток с теми же молекулами может быть использован для создания тест-систем на белки активного цитоскелета на основе иммуноэлектронной и иммунофлуоресцентной микроскопии. Это позволяет достаточно надёжно и оперативно идентифицировать различные формы актинов и открывает широкие перспективы для выяснения роли актина в структурно-функциональной организации растительной и животной клеток в фундаментальных и



прикладных исследованиях.

Полученные препараты используются для решения широкого круга фундаментальных и прикладных задач в лабораториях Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, а также Никитского ботанического сада – Национального научного центра Украины.

На защиту выносятся следующие основные положения:

1. поверхность протопластов растений после их специальной подготовки для сканирующей электронной микроскопии представляет собой сетчатую структуру, которая содержит элементы цитоскелета;
2. хлоропласты связаны в единую сеть, одним из компонентов которой является актин;
3. созданные специфические маркёры: тяжёлый меромиозин–коллоидное золото и полученные методом фагового дисплея миниантитела - позволяют выявлять как филаментную, так и мономерную формы актина, соответственно, методами дот-анализа и различными вариантами микроскопии;
4. разработанный набор маркёров в сочетании с использованными микроскопическими и биохимическими методами позволяет выявлять детальную организацию актинового цитоскелета в клетках растений.

Работа выполнена в лаборатории физиологии растительной клетки ИБФРМ РАН в рамках следующих бюджетных тем: «Изучение пространственно-временной организации белков цитоскелета клеток растений», научный руководитель темы д.б.н. Соколов О.И., № госрегистрации 01890008367; «Изучение роли актинового цитоскелета в адаптивных и коммуникационных реакциях клеток растений», научный руководитель темы д.б.н. Соколов О.И., № госрегистрации 01200606178.

Данная работа была также частично поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований: № 99-04-48833; № 04-04-48601.

Личный вклад соискателя. Экспериментальные результаты, представленные в диссертации, получены лично автором в сотрудничестве с д.б.н. Соколовым О.И. и к.б.н. Ильчуковым В.В. На защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении и анализе которых роль автора была определяющей. В иммунохимических экспериментах использовались миниантитела, полученные сотрудниками ИБФРМ РАН к.в.н. Староверовым С.А. и Костеша Н.В.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены и обсуждены на IV съезде Всероссийского общества физиологов растений и Международной конференции «Физиология растений – наука III тысячелетия», Москва, Россия, октябрь 4-9, 1999; XIV Коми республиканской молодёжной научной конференции, Сыктывкар, Россия, апрель 18-20, 2000; конференции «Цитоскелет и

клеточная регуляция», Пушкино, Россия, май 11-12, 2000; Int. Symp. «Signalling systems of Plant Cells», Moscow, Russia, June 5-7, 2001; Int. Symp. «Biological motility: New trends in research», Pushchino, Russia, Aug. 20-26, 2001; 2-й Международной конференции «Анатомия и морфология растений», Санкт-Петербург, Россия, 2002; VIII Int. Conf. «The Biology of Plant Cells *in vitro* and Biotechnology», Saratov, Russia, Sept. 9-13, 2003; V съезде общества физиологов растений России и Международной конференции «Физиология растений – основа фитобиотехнологии», Пенза, Россия, сентябрь 15-21, 2003; Всероссийской конференции «Молекулярные механизмы взаимодействия микроорганизмов и растений: фундаментальные и прикладные аспекты», Саратов, Россия, июнь 15-17, 2005; Int. Symp. «The Plant Cytoskeleton: Genomic and Bioinformatic Tools for Biotechnology and Agriculture», Yalta, Ukraine, September 19-23, 2006; VI съезде общества физиологов растений России и Международной конференции «Современная физиология растений: от молекул до экосистем», Сыктывкар, Россия, июнь 18-24, 2007.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК.

Структура работы. Диссертация изложена на 131 странице, содержит 42 рисунка, 5 таблиц и состоит из введения, основной части, содержащей три главы (обзор литературы, экспериментальная часть, результаты и обсуждение), заключения, выводов и списка использованной литературы (334 источника).

Содержание работы

В обзоре литературы даны современные сведения о системе белков цитоскелета эукариот и систематизированы данные об актиновом цитоскелете растений, его функциях и методах идентификации. В экспериментальной части описываются объекты исследований, использованные методы, полученные результаты и их обсуждение. Работа завершается обобщающим заключением и выводами.

Разработка и получение функционального маркера к F-актину на основе тяжелого меромиозина. Для исследования актинового цитоскелета необходимо иметь надёжные инструменты – маркеры на актин. Однако предлагаемые разными фирмами маркеры не покрывают все варианты и потребности визуализации или количественной оценки соотношения полимерной и мономерной форм актина, оценки функциональной активности F-актина в том или ином типе клеток. Кроме иммуноглобулиновых и фаллоидиновых маркеров, для изучения актинового цитоскелета, ассоциированного с актин-связывающими белками, весьма перспективным представляется разработка и использование “функциональных” маркеров. В частности, в работах Nakayama с соавт. (1998) были использованы фрагменты головок миозина (одного из актин-ассоциированных белков), несущие домены, ответственные за механохимическое

взаимодействие двух белков, обеспечивающих актомиозиновую подвижность *in vivo* и *in vitro*.

Мышечный миозин при низкой ионной силе способен образовывать толстые биполярные филаменты. Его молекула представляет собой асимметричный гексамер с массой 460 кД. В молекуле различают фибриллярную часть, состоящую из двух переплетенных спиралей, каждая из которых имеет на одном конце глобулярную головку, несущую две субъединицы (легкие цепи). Таким образом, гексамер включает одну пару тяжелых цепей (молекулярная масса 200 кД) и две пары легких цепей (молекулярная масса 15 и 27 кД). Все миозины обладают АТФ-азной активностью и способны связываться с F-актином (Engelhardt, Ljubimova, 1939; Поглазов, Левицкий, 1982; Foth *et al.*, 2006). У растений миозин был найден в листьях *Egeria* (Ohsuka, Inoue, 1979), в эндотарне *Lycopersicon* (Vahey, Titus *et al.*, 1982), проводящих тканях *Heracleum* (Соколов, 1985) и усиках *Pisum* (Ma, Yen, 1989). По некоторым свойствам эти миозины имеют сходство со скелетным мышечным миозином.

Ещё в начале 50-х годов были получены сведения о возможности расщепления молекулы миозина протеолитическими ферментами в определённых «шарнирных» участках (Szent-Gyorgy, 1953; Spudich, Kron *et al.*, 1985). Одним из полученных таким образом фрагментов оказался так называемый тяжелый меромиозин (ТММ), который представляет собой водорастворимый фрагмент молекулы с массой 350 кД, содержащий глобулярную часть и остаток фибриллярного хвоста молекулы (Pollard, Stafford *et al.*, 1978). Он, как и целый миозин, обладает всеми АТФ-азными активностями и сохраняет способность взаимодействовать с полимерным актином.

Для получения ТММ нами был проведен ограниченный протеолиз миозина скелетных мышц кролика трипсином и получена водорастворимая фракция ТММ. На рис. 1 представлен электронно-микроскопический снимок полученной фракции ТММ. Диаметры отдельных фрагментов колеблются от 19 до 32 нм. Так как расщепление происходило под действием трипсина, то мы получили не только глобулярные

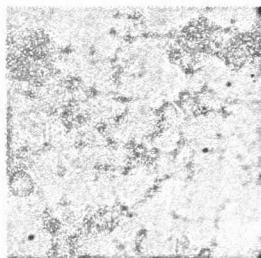


Рис. 1. Электронная микроскопия фрагментов тяжелого меромиозина, полученного путем протеолиза миозина трипсином (увеличение 44000)

фрагменты (головки), но и фрагменты с небольшой хвостовой частью молекулы миозина - так называемые «остатки хвостов», которые при низкой ионной силе раствора

способны к незначительной, по сравнению с «хвостами», агрегации. Помимо этого в препарате ТММ, по-видимому, присутствуют и другие фрагменты миозина, что также вызывает образование агрегатов, видимых на рис. 1. При приготовлении маркера ТММ-коллоидное золото мы избавлялись от таких агрегатов путем ультрацентрифугирования препарата при 100 000 g в течение 30 мин.

Полученный ТММ должен был сохранить ферментативную активность и способность взаимодействовать с F-актином. Поэтому мы провели качественный анализ АТФ-азной активности ТММ и его специфической чувствительности к действию двухвалентных катионов Ca^{2+} , Mg^{2+} и характерной K^+ -ЭДТА АТФ-азной активности.

Таблица. Определение АТФ-азной активности миозина и ТММ

Реакционная среда: 50 мМ KCl, 10 мМ Трис-HCl, pH 7.0, 0.5 мМ АТФ	Удельная ферментативная активность миозина, мкмоль Фн/мг·мин	Удельная ферментативная активность ТММ, мкмоль Фн/мг·мин
1 мМ MgCl_2	0.69	0.72
1 мМ CaCl_2	1.15	1.16
0.5 М KCl и 10 мМ ЭДТА	2.30	2.35

Фн – неорганический фосфат

Как видно из таблицы, ТММ обладает всеми, присущими целой молекуле миозина АТФ-азными активностями, в том числе и характерной K^+ -ЭДТА АТФ-азой. Полученный ТММ был сконъюгирован с частицами коллоидного золота (15 нм) по стандартной процедуре (Дыкман, Богатырёв и др., 2002).

Электронно-микроскопическое изучение взаимодействия маркера ТММ-КЗ с F-актином. С применением электронной микроскопии установлено, что полученный маркер ТММ-КЗ специфически взаимодействует с актином (рис. 2). Важно отметить то, что фон практически не содержит свободных частиц маркера, что говорит о его высокой специфичности. Также следует отметить, что частицы маркера взаимодействуют только с актином (не агрегируют между собой) и высоко монодисперсны.

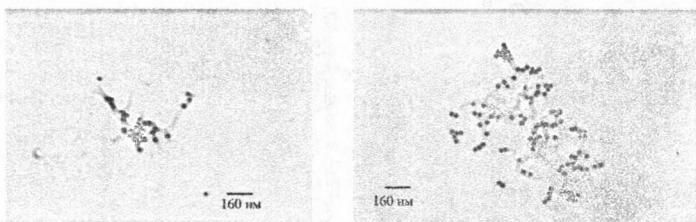


Рис. 2. Мечение маркером ТММ-КЗ куриного и кроличьего F-актина в концентрации 150 мкг/мл. Препараты дополнительно контрастировали 1%-м уранилацетатом

Среди других маркёров на актин ТММ-КЗ уникален тем, что, как и миозин, является актин-связывающим белком, актин-связывающие участки которого находятся именно на головках. Для наблюдения взаимодействия полученного маркёра с актиновыми нитями в ЭМ не требуется его дополнительного контрастирования, так как КЗ является электронно-плотным материалом. Следует отметить, что полученный маркёр сохраняет способность взаимодействовать с актином так же, как и исходный ТММ, поскольку при конъюгации он связывается с частицами КЗ нековалентно, и слабые связи не нарушают нативность молекулы.

Таким образом, нами был получен биоспецифический маркёр ТММ-КЗ, который даёт уникальную возможность идентифицировать актины как животного, так и растительного происхождения при микроскопировании и в дот-анализе. Кроме того, данный маркёр является функциональным, то есть при внесении АТФ частицы маркёра диссоциируют от актиновых филаментов и способны перемещаться вдоль них. Следовательно, с использованием данного маркёра появляется уникальная возможность наблюдать и моделировать *in vitro* взаимодействие актина и миозина, которое лежит в основе биологической подвижности.

Получение антиактиновых антител с помощью технологии фагового дисплея миниантител. Антитела находят широчайшее применение в медицине и научных исследованиях. Существенным шагом явилась разработка технологии моноклональных антител. В последние годы был разработан подход, заключающийся в использовании так называемого фагового дисплея фрагментов антител. Эта технология состоит в конструировании библиотек антител, экспонированных на нитевидных фагах или фагемидах. Впервые возможность экспрессии одноцепочечных последовательностей, составленных из переменных доменов антител в составе гибридного белка оболочки фага, была продемонстрирована в работах Грегга Винтера и Джона МакКаферти в 1990 году. Они же разработали метод быстрой и эффективной селекции клонов, несущих высокоаффинные антитела, с помощью антигена.

В работе использовали комбинаторную фаговую библиотеку миниантител овцы, любезно предоставленную профессором Уильямом Харрисом (Harris, Cunningham, 1995). В качестве антигена для селекции миниантител использовали очищенный актин из скелетных мышц кролика. Для выделения наиболее специфичных и высокоаффинных миниантител проводили 3 раунда селекции. От раунда к раунду постепенно понижали концентрацию фаговых частиц от 10^{12} до 10^{10} мл⁻¹. Кроме того, уменьшали время инкубации актина с фаговой библиотекой: в первом раунде инкубацию проводили в течение ночи при 4°C, во втором и третьем раундах – 1.5 ч и 1 ч при комнатной температуре.

Обогащенную таким образом библиотеку рассеивали на чашки Петри. После трех

раундов аффинной селекции проводили иммуноскрининг колоний с применением системы ECL. Около 80% выросших колоний дали положительный сигнал, что указывает на высокую эффективность процедуры аффинной селекции библиотеки. Для дальнейшей работы было выбрано 11 клонов, которые дали наиболее выраженный сигнал (яркость пятна).

Для миниантител, продуцируемых выбранными клонами, были определены константы аффинности с помощью метода, описанного в работе (Beatty, Beatty *et al.*, 1987). Из значений $K_{афф}$ ($1.6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) можно сделать вывод, что использование комбинаторной фаговой библиотеки с проведением нескольких раундов селекции позволило нам получить клоны, продуцирующие растворимые миниантитела со средней аффинностью к кроличьему актину. Эти миниантитела оказались пригодными для иммуногистохимического выявления актина, тем более что антитела с более высокими значениями $K_{афф}$ часто приводят к ложноположительным результатам.

Создание тест-систем к различным формам актина на основе золотых маркёров. Метод дот-анализа с применением биоспецифических маркёров - конъюгатов КЗ, находит все более широкое распространение благодаря его высокой чувствительности и простоте выполнения.

На рис. 3 представлена детекция гладкомышечного F-актина маркёром ТММ-КЗ в дот-анализе. Дополнительно этот маркёр позволяет оценивать и функциональные свойства АТФ-зависимого актомиозинового взаимодействия.

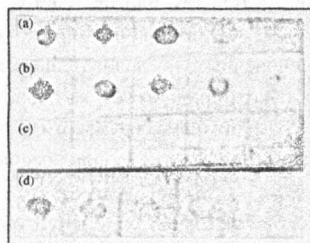


Рис. 3. Дот-анализ куриного F-актина (а, d), G-актина (b) и БСА (с) в последовательных двукратных разведениях (начальная концентрация 1 мг/мл) с использованием маркёра ТММ-КЗ, контроль специфичности АТФ-зависимого связывания ТММ-КЗ в присутствии 5 мМ АТФ (d)

Мы сравнили чувствительность и специфичность полученных антиактиновых фаговых миниантител. Фаговые миниантитела выявляют препараты актина как из гладких и поперечнополосатых мышц животных (курицы, кролика), так и из листьев бобов (рис. 4).

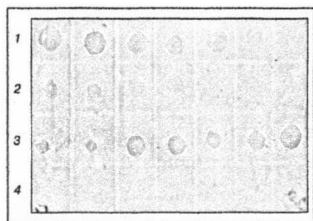


Рис. 4. Дот-анализ актинов различного происхождения с использованием фаговых миниантител. Последовательные двойные разведения: 1 – куриного гладкомышечного актина (начальная концентрация 0.4 мг/мл), 2 – актина из листьев *V. faba* (0.25 мг/мл), 3 – кроличьего актина (0.25 мг/мл), 4 – овальбумин (контроль)

Чувствительность иммунодот-анализа с миниантителами в детектировании трех разных актинов различалась незначительно: так, для куриного актина она составила 12 нг, кроличьего – 4 нг, растительного – 15 нг. Широкая специфичность в отношении разных актинов и близкие значения чувствительности их выявления позволяют предполагать, что полученные миниантитела связываются с антигенной детерминантой, высоко консервативной для всех трех актинов.

Кроме того в нашей лаборатории ранее были получены поликлональные кроличьи антитела к актину из гладких мышц куриных желудков, которые способны выявлять как G-, так и F-форму куриного и кроличьего актина в дот-анализе иммунозолотым маркером на их основе с одинаковой чувствительностью – 25 нг. Растительный актин эти антитела не выявляют.

Помимо этого мы подтвердили ранее полученные данные (Рихтер, Грингауз и др., 1990; Грингауз, Негрецкий и др., 1998), что маркер фаллоидин-КЗ даёт уникальную возможность выявлять только F-форму актина. Синтезированный нами аналогичный маркер способен выявлять как растительный, так и мышечный F-актин с чувствительностью 50 нг, мышечный G-актин связывания с маркером не показал. Необходимо отметить, что во всех вариантах применения маркеров – конъюгатов коллоидного золота в качестве контролей мы использовали меченные коллоидным золотом неспецифические реагенты – бычий сывороточный альбумин или овальбумин.

Таким образом, представленные выше маркеры могут быть использованы для анализа актинового цитоскелета в любых препаратах. Миниантитела способны выявлять актин в любых растительных и животных клетках. Фаллоидин-КЗ специфично выявляет F-формы актина, а маркер ТММ-КЗ позволяет оценивать функциональные свойства АТФ-зависимого актомиозинового взаимодействия. Дот-анализ можно использовать как экспресс-метод для предварительной оценки количества актина в препаратах, а также выявления его G- и F-форм.

Исследование топографии цитоскелета растительных клеток с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Наличие клеточной стенки представляет определённые трудности для изучения цитоскелета растений. Получение изолированных протопластов даёт возможность обойти эти трудности. Для наблюдения

с помощью СЭМ был использован модифицированный нами метод подготовки протопластов, не связанный с применением аппарата «критическая точка».

Основная масса свежeweделенных протопластов из каллусной ткани моркови и табака и листьев табака и бобов имела одинаковую топографию поверхности. Протопласты диаметром от 10 до 25 мкм имели незначительно шероховатую поверхность без видимых структурных образований с немногочисленными порами (рис. 5А). По-видимому, при обработке препаратов осмиевой кислотой (Pollak, Varndell, 1985) в плазмалемме фиксируются все белковые мембранные и трансмембранные комплексы в липидном окружении. Такую же фиксацию обычно используют при подготовке препаратов классическим способом – с применением аппарата «критическая точка» (Jasik, Smolenskaya *et al.*, 1992).

Существенные отличия мы наблюдали в вариантах без стадии дополнительной фиксации осмиевой кислотой.

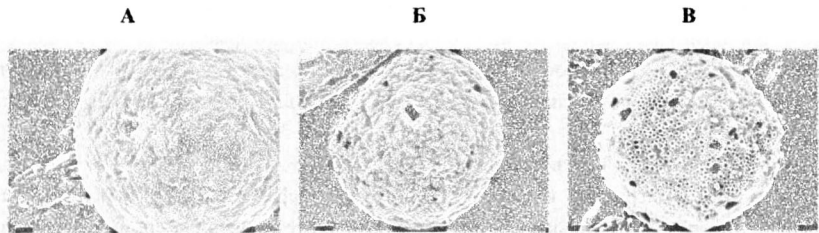


Рис. 5. Топография поверхности протопластов:

- А) протопласт клетки листа табака. Фиксация: 0.5% глutarовый альдегид+2% формальдегид. Постфиксация: 1% осмиевая кислота. Масштабная линейка – 1.5 мкм;
- Б) протопласт клетки каллусной ткани моркови. Фиксация как для (А). Постфиксацию осмиевой кислотой не проводили. Масштабная линейка – 1.5 мкм;
- В) протопласт клетки каллусной ткани моркови. Фиксация и постфиксация как для (Б). Масштабная линейка – 1.1 мкм

Выявлено два типа протопластов, отличающихся топографией поверхности: 1. диаметром около 15 мкм с бугристой поверхностью и округлыми образованиями размером 0.5-1.5 мкм, периметр которых окаймлен глобулами размером 0.3 мкм (рис. 5Б); 2. диаметром 10-12 мкм с сетчатой поверхностью без видимых структурных образований (рис. 5В). Сетчатая поверхность представлена конусовидными ячейками различной высоты. Протопласты без фиксации осмиевой кислотой, скорее всего, теряют липидные компоненты при обезвоживании органическими растворителями, и мы наблюдаем сетчатую структуру поверхности. Детальный анализ микрорельефа поверхности выявляет значительное количество пор, похожих по топографии на окаймленные пузырьки.

При наблюдении в СЭМ мы обнаружили агрегаты протопластов, соединённых многочисленными тяжами, которые, возможно, представляют собой элементы плазмодесм.

Мы предполагаем, что выявляемый СЭМ сложный микрорельеф поверхности протопластов образован в том числе и компонентами цитоскелета, в частности актиновой составляющей. В ряде случаев происходило разрушение протопластов, что приводило к экспонированию внутреннего кортикального слоя цитоплазмы (рис. 6). По сравнению с внешней, внутренняя поверхность имеет более сложную топографию.

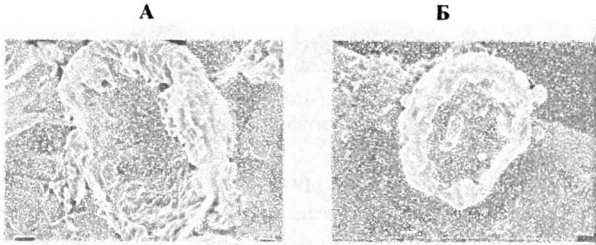


Рис. 6. Внутренняя топография разрушенных протопластов:

- А) протопласт из каллуса моркови. Фиксация: 0.5% глутаровый альдегид + 2% формальдегид. Без постфиксации осмиевой кислотой. Масштабная линейка – 1.5 мкм;
- Б) протопласт из каллуса табака. Фиксация как для (А). Масштабная линейка – 1.5 мкм

На рис. 6 видно, что внутренний слой представляет густую сеть переплетенных тяжей, филаментов и их агрегатов. Хотя говорить об идентификации актиновой составляющей на препаратах, подготовленных для СЭМ, не представляется возможным, тем не менее, основываясь на данных, полученных нами в других вариантах микроскопии, можно с большой долей вероятности утверждать о наличии актина в этом надмолекулярном ансамбле. Известно, что получение протопластов является стрессовым фактором для клетки, при этом часть цитоматрикса может разбираться. И всё-таки мы наблюдали, что определенная доля органелл остается закрепленной на толстых тяжах (рис. 7). По-видимому, они представляют собой транскитоплазматические тяжи, которые являются частью единой сенсорной системы клетки, контролирующей расположение органелл и их движения в ответ на внешние сигналы.

Полученные нами результаты позволяют дополнить сведения о том, что в ходе онтогенеза растительной клетки происходят существенные изменения в структуре субкортикального цитоматрикса. Так, на стадии перехода от деления к растяжению клетки характеризуются менее развитой системой субкортикального цитоматрикса, а на стадии растяжения происходит его утолщение. В дифференцированных клетках

субкортикальный цитоматрикс вновь принимает вид “рассеянной” сети, что предположительно связано с обеспечением функциональной активности плазмалеммы.

А

Б

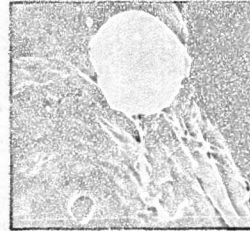


Рис. 7. Органеллы из разрушенных протопластов листа табака. Фиксация и постфиксация как в рис. 6. Масштабная линейка – 3 мкм

Изучение топографии и объёмной организации хлоропластов в протопластах.

Как было сказано ранее, без постфиксации препаратов осмиевой кислотой часть протопластов разрушается, открывая внутриклеточную организацию, в том числе и органелл (рис. 8). Мы обнаружили, что на препаратах протопластов из листьев табака и бобов хлоропласты часто образуют единую структуру, соединяясь друг с другом несколькими “толстыми” тяжами (рис. 8А).

А

Б

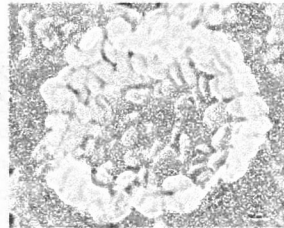
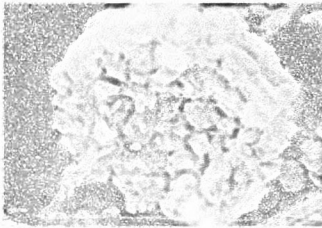


Рис. 8. Внутриклеточная организация комплекса хлоропластов:

- А) разрушенный протопласт из мезофилла табака. Фиксация: 0,5% глutarовый альдегид + 2% формальдегид. Постфиксацию осмиевой кислотой не проводили. Масштабная линейка – 3 мкм;
- Б) организация хлоропластов в клетках листа бобов. Масштабная линейка – 5 мкм

Тяжи, соединяющие хлоропласты (если предположить их наиболее вероятную активную природу), могут иметь двойную функцию. Во-первых, они могут участвовать с помощью моторных белков в перемещении органелл, обеспечивая наиболее оптимальное расположение хлоропластов. Во-вторых, удерживать хлоропласты в токе

цитоплазмы.

Применение маркера фаллоидин–коллоидное золото в световой микроскопии.

Принципы визуализации золотых маркеров в световом микроскопе основаны на свойствах КЗ поглощать (просвечивающая) и рассеивать (темнопольная и эпиполяризационная микроскопия) видимый свет.

Исследования проводили на тонких срезах каллусных тканей табака и моркови, а также листьев табака и бобов, заключенных в полиэтиленгликоль 1500. С помощью маркера фаллоидин–КЗ и последующего усиления солями серебра (Миронов, Комисарчик и др., 1994) можно локализовать актин-содержащие структуры клеток (рис. 9).

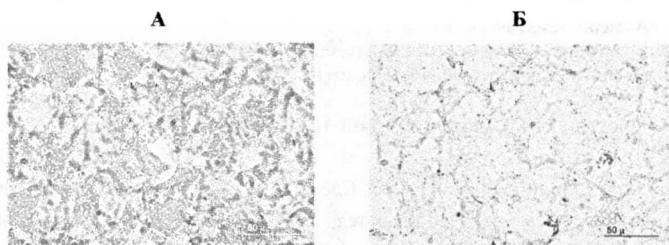


Рис. 9. Актин–содержащие структуры на полутонком срезе каллусной ткани табака. Фаллоидин–КЗ, усиление серебром (масштабная линейка 50 мкм): А) автофлуоресценция клеток каллусной ткани табака; Б) выявление актиновых филаментов

Традиционным приёмом, обеспечивающим хорошую сохранность морфологических структур, является заключение материала в парафин или в синтетические смолы. Однако эта процедура может привести к разрушению или изменению антигенных детерминант, поэтому мы заключали растительные ткани в полиэтиленгликоль, что: 1) исключает воздействие ксилола и других органических растворителей; 2) позволяет снизить температуру заключения; 3) вызывает меньшее сжатие ткани (5% от исходного объёма, вместо 50% - в парафине); 4) занимает в два раза меньше времени; 5) обеспечивает сохранность антигенных детерминант. Заключение в полиэтиленгликоль позволяет получать тонкие срезы до 0.25 мкм.

На срезах каллусных тканей моркови и табака можно выделить несколько типов распределения филаментов актина:

1. в цитоплазме клетки наблюдается рассеянное распределение маркера (рис. 9);
2. меристематические зоны представлены клетками с большим количеством F-актина (рис. 10А);
3. много маркера выявляется вокруг ядер клеток (рис. 10Б);
4. очень мало маркера обнаруживается в сильно вакуолизированных клетках (рис. 10В).

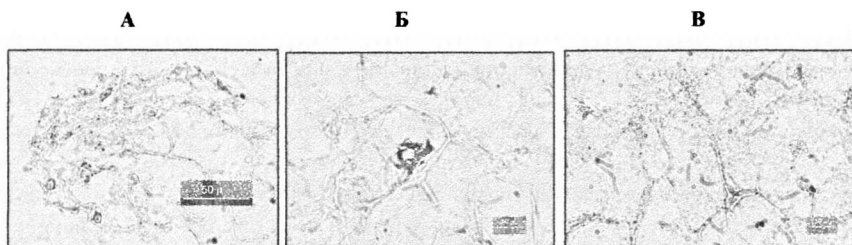


Рис. 10. Выявление актин-содержащих структур на полутонких срезах каллусной ткани моркови. Фаллоидин-К3 (усиление серебром):

- А) меристематическая зона;
- Б) актиновые филаменты, выявляемые вокруг ядер;
- В) сильно вакуолизированные клетки

В незембрионных клетках каллусной ткани можно видеть обширную актиновую сеть (рис. 10В), которая выявляется на полутонких срезах в виде диффузного распределения фаллоидинового маркера. Клетки почти любой каллусной ткани сильно вакуолизированы, здесь не наблюдается четко выраженной структуры. Внутри некоторых клеток (рис. 10Б) видна интенсивная “посадка” маркера, свидетельствующая о значительном содержании актинового компонента. Судя по размерам и расположению органелл, актиновые филаменты группируются около ядра. В литературе подобную структуру называют корзинкой и одной из её белковых составляющих являются филаменты актина. Но на рис. 9 и 10В количество актиновых филаментов около ядер незначительно. Скорее всего, это связано с фазой клеточного цикла. На срезах листьев бобов (рис. 11) маркер фаллоидин-К3, усиленный серебром, обнаруживается в наибольшем количестве вокруг хлоропластов. По литературным данным, хлоропласты окружены цитоскелетной сетью, и главной её составляющей являются микрофиламенты. Также много филаментов актина визуализируется в эпидермальных и устьичных клетках.

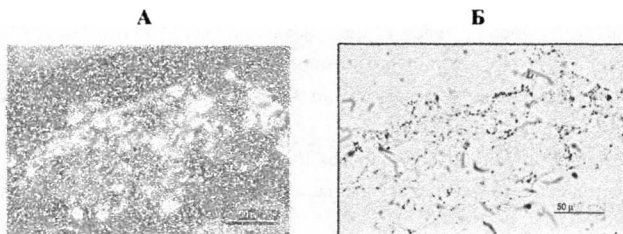


Рис. 11. Выявление F-актина на поперечном срезе листа бобов: А) автофлуоресценция
Б) фаллоидин-К3, усиление серебром (один и тот же препарат)

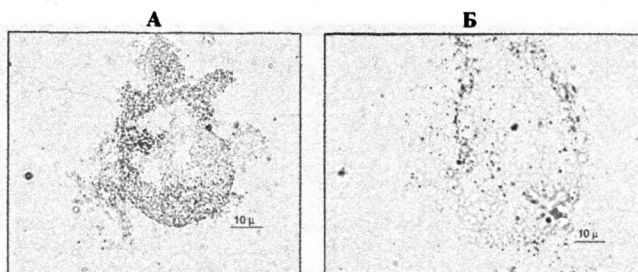


Рис. 12. Актиновые филаменты в протопластах из листа табака. Фаллоидин-КЗ, усиление серебром:

- А) актиновые филаменты в субкортикальной зоне клетки;
- Б) актиновые филаменты в комплексе хлоропластов

На препаратах протопластов (рис. 12) видны места наибольшего распределения F-актина в субкортикальной зоне клетки и вокруг хлоропластов (черное окрашивание серебром). По-видимому, актин в составе сложной сети цитоскелета не может быть полностью выявлен этим маркером в связи с экранированием участков связывания фаллоидина другими актин-ассоциированными белками. Также следует принять во внимание присутствие G-формы актина, которая не визуализируется фаллоидиновым маркером.

Таким образом, нам удалось выявить две преимущественные конфигурации актинового цитоскелета, характерные для исследованных нами растительных объектов:

- а) субкортикальная цитоплазматическая микрофиламентная сеть;
- б) сеть, окружающая поверхности органелл.

Иммунохимический анализ белков актинового цитоскелета растений с использованием фаговых миниантител. Достаточно высокая чувствительность фаговых миниантител в выявлении актинов различного происхождения позволила использовать их в иммуногистохимических методах окрашивания.

Мы использовали непрямой вариант иммуномечения («сэндвич-метод» или «мостиковый метод»), который позволил получить яркое четкое свечение маркера (в качестве первичных использовали антиактиновые фаговые миниантитела, вторичных - антифаговые кроличьи антитела, и третичных - FITC-меченые ослиные антикроличьи антитела). Специфичность реакций проверяли, сопровождая каждую серию опытов рядом контролей. Миниантитела выявляют как филаментный, так и мономерный актин. На рисунке 13А видна субкортикальная сеть, выявляемая на тенях протопластов. В разрушенном протопласте наблюдается не только субкортикальная актиновая сеть (рис. 13Б), но и наличие актина вокруг хлоропластов (рис. 13В).

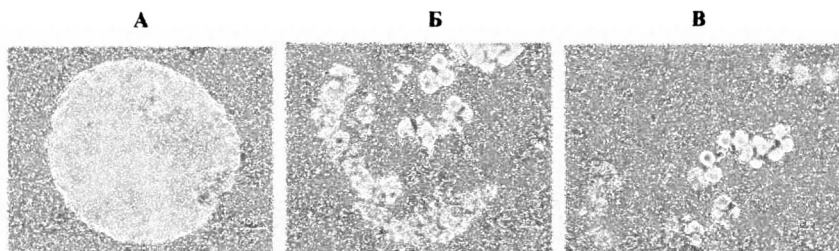


Рис. 13. Актиновая сеть на тенях протопластов из листьев бобов. Выявление фаговыми миннантителами (непрямое иммуномечение):

- А) общий вид актиновой сети протопласта;
- Б) субкортикальная актиновая сеть в разрушенном протопласте;
- В) актин вокруг хлоропластов

Сравнительный анализ актин-содержащих структур в клетках растений. Для комплексного анализа актин-содержащих структур в клетках растений мы сравнивали результаты, полученные с маркёрами, сделанными в нашей лаборатории, а также маркёром фаллоидин-TRITC фирмы “Sigma” (США) при разнообразных вариантах микроскопии. Особое внимание было уделено изучению структурной организации субкортикального слоя цитоскелета клеток растений и организации хлоропластов с помощью сканирующей, иммунофлуоресцентной и электронной микроскопии.

Как уже отмечалось выше, на “сколах” протопластов (рис. 6А) была обнаружена “шуба”, толстый слой (до нескольких мкм) субкортикального цитоматрикса, состоящий из сети переплетённых филаментов и их пучков в виде кольцевидных образований и волнообразных складок. Мы предполагаем, что такое сильное развитие субкортикального цитоскелета в протопластах из клеток каллусной ткани моркови обусловлено его участием не только в обеспечении функциональной активности плазмалеммы, но и в механическом поддержании формы клеток.

Биохимическая природа элементов, составляющих субкортикальный слой цитоматрикса, остаётся пока не полностью изученной. Однако на “тенях” протопластов нами показано, что в его образовании (рис. 12 и 13) участвуют актиновые элементы, выявляемые разными маркёрами.

Антиактиновыми фаговыми миннантителами (рис. 13Б) мы выявляем как мономеры, так и филаменты актина в субкортикальной зоне протопластов, а в ряде случаев необходима дифференциация филаментов от мономеров. Поэтому кроме антител также использовали фаллоидин, который специфически связывается только с F-актином (рис. 12). Такой подход позволяет более полно охарактеризовать актиновый цитоскелет.

Цитоскелетный остов, сохраняющийся после фиксации клеток, отличается сложным строением, в нем сохранены многие элементы, связывающие цитоскелет с ядром, органеллами и плазмалеммой. Белки цитоскелета соединяются друг с другом специфичным для каждого типа клеток образом и формируют сложные, динамические, взаимодействующие между собой структуры.

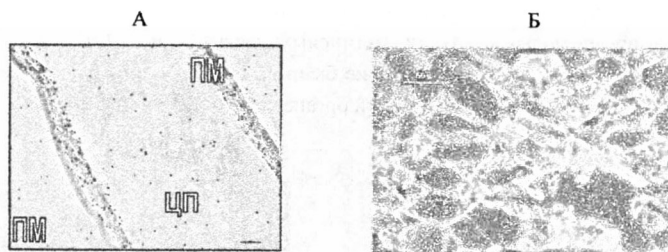


Рис. 14. Локализация F-актин содержащих субкортикальных структур:

- А) ультратонкие срезы апикальных клеток стебля мари красной. Фаллоидин-К3 (10 нм). Масштабная линейка - 100 нм. (ПМ – плазмалемма, ЦП – цитоплазма);
- Б) полутонкие срезы клеток каллусной культуры фикуса лировидного. Фаллоидин-TRITC

Чёткость выявления тех или иных структур во многом объясняется функциональным состоянием клеток. В связи с этим мы дополнили наши традиционные объекты исследования контрастными по физиологическому статусу тканями – меристематическими клетками апекса стебля мари красной (рис. 14А) и большими паренхимными клетками каллусной ткани фикуса лировидного (рис. 14Б). На ультратонких срезах стеблевого апекса (рис. 14А) можно четко выделить электронно-плотные структуры с интенсивным мечением маркёром фаллоидин-К3. Прежде всего, это густая электронно-плотная сеть тонких филаментов, хорошо различимая в субкортикальной зоне клеток. Известно, что в этих компартментах клетки идут активные физиологические процессы, связанные с растяжением и синтезом вторичной клеточной стенки, в которых значительную роль, наряду с микротрубочками, играют и микрофиламенты. Актиновые филаменты могут контролировать характер распределения микротрубочек и, таким образом, влиять на расположение и ориентацию фибрилл целлюлозы клеточной стенки.

Каллусные клетки (рис. 14Б) обладают менее развитой клеточной стенкой. Субкортикальный цитоматрикс этих клеток показывает значительное количество актиновых филаментов, которые располагаются по периметру клетки параллельно оси растяжения и, скорее всего, могут служить транспортными направляющими для

секретируемых везикул.

Вернёмся к наличию элементов цитоскелета в организации хлоропластов, что было показано в ряде работ (Kandasamy, Meagher, 1999; Baluska, Jasik *et al.*, 2001; Cardenas, Lovy-Wheeler *et al.*, 2005). Хлоропласты остаются в единой сети при мягком лизисе мембраны (рис. 8). В системе хлоропластов, по литературным данным, имеется два варианта организации микрофиламентов актина, подтверждаемых и нашими результатами: продольные пучки актиновых тяжей (рис. 13В) и беспорядочно ориентированные филаменты. Последние были выявлены нами в виде рассеянной сети на некотором расстоянии от поверхности органелл (рис. 12).

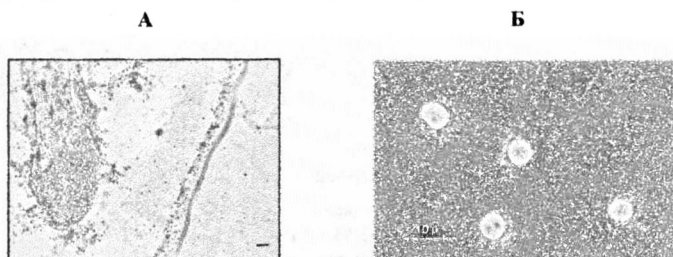


Рис. 15. Локализация F-актин содержащих структур вокруг хлоропластов:

- А) ультратонкие срезы апикальных клеток стебля мари красной. Фаллоидин-К3 (10 нм). Масштабная линейка - 100 нм;
- Б) отдельные хлоропласты из листьев бобов. Фаллоидин-TRITC

На рис. 15А хорошо различимы электронно-плотные сетевидные структуры с интенсивной посадкой фаллоидинового маркера как в субкортикальной зоне, так и вокруг хлоропласта. При разрушении комплекса хлоропластов (рис. 15Б) вокруг индивидуальных хлоропластов хорошо видна интенсивная посадка маркера фаллоидин-TRITC, что говорит о значительном присутствии полимерного актина вокруг органелл. Следует отметить, что при подготовке таких препаратов F-актин быстро разрушается, видимо, под воздействием эндогенных протеаз, поэтому было важно разработать условия для максимального сохранения актиновых филаментов для микроскопических исследований.

Известно, что актиновые микрофиламенты играют важную роль в создании лабильной системы заякоривания хлоропластов и изменения их ориентации, причем этот процесс может осуществляться через регуляцию баланса пулов мономерного и филаментного актина вблизи поверхности органеллы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Живая растительная клетка содержит тонко регулируемую систему белков цитоскелета и обладает способностью адекватным образом реагировать на изменяющиеся условия внешней среды. Обнаруживаются все новые и новые цитоскелетные белки. Однако современных знаний недостаточно для понимания сложной архитектуры цитоскелета и “хореографии клетки”, т.е. движения ее различных компонентов во времени и пространстве. Но такое движение и позволяет клетке поддерживать множественные функции. Цитоскелет не только определяет внутреннюю организацию отдельной клетки, роль цитоскелета шире – создаваемые им силы натяжения могут определять архитектуру многоклеточных образований – тканей и органов растений.

Сведения, имеющиеся в литературе, говорят о структурной и генетической консервативности актинов клеток животных и растений. Данные о взаимодействии препаратов актина растений с антителами к актину из тканей животных, связывание их с маркерами на основе фаллоидина подтверждают функциональное и структурное родство актинов животного и растительного происхождения на уровне биохимических препаратов. Это говорит о наличии сходных функций, выполняемых актиновым цитоскелетом. Актин в клетках существует в динамическом равновесии полимерной и мономерной форм. Одним из важных компонентов цитоскелета являются актиновые микрофиламенты. Применение маркера “фаллоидин-коллоидное золото” дало возможность визуализации элементов актинового остова в протопластах, тонких и ультратонких срезах и субклеточных препаратах. В цитоплазме исследуемых клеток выявлены преимущественные конфигурации актинового скелета: а) толстые филаментные тяжи, пронизывающие цитоплазму и вакуоли; б) цитоплазматическая микрофиламентная сеть, которая окружает и внутриклеточные органеллы; в) субкортикальная сеть F-актина.

Таким образом, световые и электронно-микроскопические данные наших исследований и других авторов дают основание рассматривать актиновый цитоскелет растений как обширную и динамичную трехмерную структуру, объединяющую всё пространство растительной клетки от плазмалеммы до органелл.

Изучение топографии и структурной организации сложной надмолекулярной системы белков, в основе которой лежит актиновый цитоскелет, необходимо для формирования более полной картины функционирования растительной клетки. Выяснение разнообразных функций цитоскелета во многом основано на исследованиях его структурной организации и выявлении составляющих его компонентов. Возможно, этому могут способствовать оригинальные маркеры и новые подходы визуализации актинового цитоскелета, представленные в данной работе.

ВЫВОДЫ

1. В клетках растений выявлены и проанализированы два типа организации актинового цитоскелета: субкортикальная цитоплазматическая сеть и сеть, окружающая поверхности органелл.
2. Внутренняя поверхность протопластов, по данным сканирующей электронной микроскопии, имеет более сложную организацию, по сравнению с наружной. Иммунохимическое мечение позволяет выявить “реплики” мест прикрепления клеточных органелл и их связь с актиновым цитоскелетом.
3. Методом фагового дисплея получены минiantiтела к актину, которые с высокой чувствительностью способны детектировать актины растительного происхождения в дот-анализе и иммунофлуоресцентной микроскопии.
4. Специфический маркер на основе конъюгата тяжелого меромиозина с коллоидным золотом выявляет актин в дот-анализе и электронной микроскопии. С его помощью можно оценивать функциональные свойства АТФ-зависимого актомиозинового взаимодействия.
5. Все созданные маркеры (антитела, минiantiтела, фаллоидин и тяжёлый меромиозин в комплексе с коллоидным золотом и флуоресцентными метками) могут быть применены в методах дот-анализа, световой и электронной микроскопии для получения полноценной информации о состоянии актинового цитоскелета как в отдельной растительной клетке, так и в тканях растений.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Соколов О.И., Кривопапов Ю.В., Соколова М.К., Ильчуков В.В. Элементы актинового цитоскелета в протопластах клеток растений // Тез. 4-го съезда о - ва физиологов растений России и международной конф. “Физиология растений - наука III тысячелетия”, Москва, октябрь 4-9, 1999. - С. 123-124.
2. Соколов О.И., Кривопапов Ю.В., Соколова М.К., Ильчуков В.В. Топография поверхности и элементы актинового цитоматрикса протопластов клеток растений // Тез. конф. “Цитоскелет и клеточная регуляция”, Пушкино, май 11-12, 2000. - С. 34.
3. Соколов О.И., Кривопапов Ю.В., Соколова М.К., Ильчуков В.В. Топография поверхности и структурная организация хлоропластов в протопластах клеток листьев табака // Тез. 14-й Коми респ. молодежной науч. конф., Сыктывкар, апрель 18-20, 2000. - С. 208-209.
4. Соколов О.И., Кривопапов Ю.В., Соколова М.К., Ильчуков В.В., Носов А.В. Топография поверхности и элементы цитоматрикса протопластов растительных клеток // Физиология растений. - 2001. - Т. 48, № 3. - С. 447-454.
5. Sokolov O.I., Krivopalov Yu.V., Sokolova M.K., Il'chukov V.V., Nosov A.V. Surface topography and cytomatrix elements in protoplasts from plant cells // Abstr. Int. Symp. "Biological motility: new trends in research", Pushchino, Aug. 20-26, - 2001. - P. 148-150.
6. Sokolov O.I., Krivopalov Yu.V., Sokolova M.K., Il'chukov V.V., Nosov A.V. The role of

- actin cytoskeleton in cell wall formation of plant protoplasts (SEM study) // Ibid. - P. 110.
7. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Зайцева И.С., Соколова М.К., Иванов В.В., Соколов О.И. Использование конъюгатов коллоидного золота для идентификации актинов различного происхождения // Биофизика. - 2002. - Т. 47. - Вып. 4. - С. 632-640.
 8. Ильчуков В.В., Соколова М.К., Кривопапов Ю.В., Соколов О.И. Топография поверхности протопластов клеток растений // Тез. 2-й международной конф. "Анатомия и морфология растений", Санкт-Петербург, 2002. - С. 243-244.
 9. Sokolov O.I., Krivopalov Yu.V., Il'chukov V.V., Sokolova M.K. Surface topography of plant-cell protoplasts during cultivation // Abstr. 8 Int. Conf. "The Biology of Plant Cells *in vitro* and Biotechnology", Saratov, Sept. 9-13, 2003. - P.292-293.
 10. Соколова М.К., Ильчуков В.В., Кривопапов Ю.В., Соколов О.И. Актиновый цитоматрикс и субклеточная организация растительной клетки // Тез. 5-го съезда о-ва физиологов растений России и международной конф. "Физиология растений - основа фитобиотехнологии", Пенза, сентябрь 15-21, 2003. - С. 111-112.
 11. Ильчуков В.В., Соколова М.К., Соколов О.И. Субкортикальный цитоскелет клеток растений // Тез. Всеросс. конф. "Молекулярные механизмы взаимодействия микроорганизмов и растений: фундаментальные и прикладные аспекты", Саратов, июнь 15-17, 2005. - С.45-46.
 12. Орлов В.П., Соколова М.К., Соколов О.И. Участие белка 56-kDa в структурировании актиновых филаментов и его локализация в клетках листьев *Vicia faba* L. // Там же. - С. 50-51.
 13. Orlov V.P., Sokolova M.K., Sokolov O.I. Effect of a 56-kDa protein on the structure of actin filaments and its localization in the cells of *Vicia faba* L. // Abstr. Int. Conf. "The plant cytoskeleton: genomic and bioinformatic tools for biotechnology and agriculture", Yalta, Ukraine, Sept. 19-23, 2006. - P. 73.
 14. Орлов В.П., Соколова М.К., Соколов О.И. Влияние белка 56 кД на структуру актиновых филаментов и его локализация в клетках листьев *Vicia faba* L. // Тез. 6-го съезда о-ва физиологов растений России и международной конф. «Современная физиология растений: от молекул до экосистем», Сыктывкар, июнь 18-24, 2007. - С. 191-193.
 15. Ильчуков В.В., Соколова М.К., Соколов О.И. Структура цитоматрикса протопластов клеток растений // Там же. - С. 164-166.
 16. Соколов О.И., Ильчуков В.В., Соколова М.К. Разработка и применение наномаркёров для изучения структуры цитоматрикса клеток высших растений // Тез. 15-й международной конференции «Высокие технологии в биологии, медицине и геоэкологии», Новороссийск, сентябрь 10-14, 2007. - С. 114-115.

Подписано в печать 20.02.08. Гарнитура Times New Roman 8.
Формат 60x84 1/16. Объем 1 усл. печ. л. Тираж 100 экз.

Отпечатано в ИБФРМ РАН
41049 Саратов, пр. Энтузиастов, 13.